

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Juli 2005 (07.07.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/062019 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 15/14**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014542

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 2004 (21.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 61 073.1 22. Dezember 2003 (22.12.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **INNOVATIS AG** [DE/DE]; Meisenstrasse 96, 33604
Bielefeld (DE).

Gütersloh (DE). **STÜRZ, Marc** [DE/DE]; Rosenheide 14,
33611 Bielefeld (DE).

(74) **Anwalt: HEILAND, Karsten**; Meissner, Bolte & Partner,
Hollerallee 73, 28209 Bremen (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(72) Erfinder; und

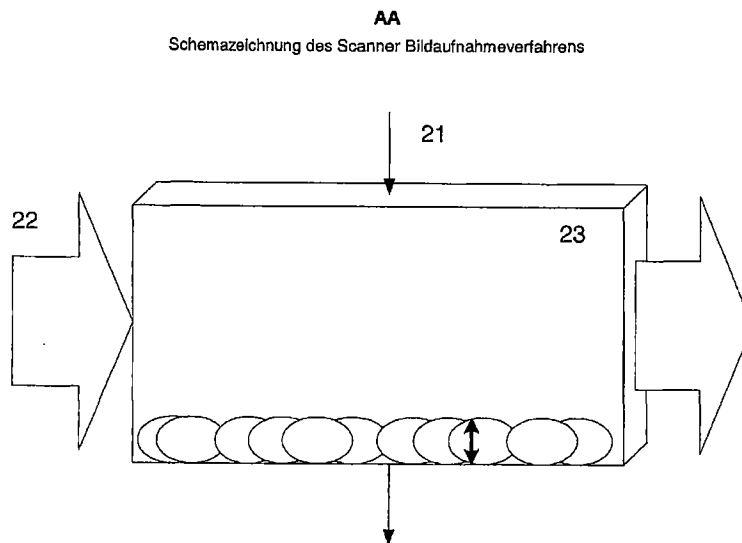
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **GUDERMANN,
Frank, Theodor** [DE/DE]; Breslauer Strasse 6, 33335

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD AND DEVICE FOR RECORDING MICROSCOPIC IMAGES

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR AUFNAHME MIKROSKOPISCHER BILDER



AA ...DIAGRAMMATIC VIEW OF THE SCANNER IMAGE RECORDING METHOD

(57) **Abstract:** The invention relates to a method and a device for recording high-resolution microscopic images of particles or organisms that are suspended in a liquid. According to the invention, the suspension is introduced into a measuring cell, especially a flow-through cell (23), and the image of the suspension is recorded by an optical sensor. The optical sensor and the measuring cell are moved relative to one another while the content of the measuring cell is represented as a whole or in part.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/062019 A1



ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Aufnahme mikroskopischer Bilder mit hoher optischer Auflösung von in einer Flüssigkeit suspendierten Partikeln oder Organismen, wobei die Suspension in eine Messzelle, insbesondere Durchflusssküvette (23), eingebracht wird und das Bild der Suspension von einem optischen Sensor aufgenommen wird und wobei sich optischer Sensor und Messzelle relativ zueinander bewegen und der Inhalt der Messzelle dabei ganz oder teilweise abgebildet wird.

Verfahren und Vorrichtung zur Aufnahme mikroskopischer Bilder

Beschreibung

Die Erfindung befasst sich mit der Erzeugung mikroskopischer Bilder durch Scannen einer Messzelle mit einem optischen Sensor. Vorzugsweise handelt es sich bei der Messzelle um eine Durchflussküvette. Zur Vereinfachung ist nachfolgend nur letztere genannt.

- 5 Die innovatis AG entwickelt, produziert und vertreibt Geräte zur Partikel- und Zellanalyse. Zur Analyse der Zelldichte, zur Klassifizierung in lebende und tote Zellen und zur Bestimmung von Objektdurchmesser und Objektgeometrie werden Bilder von Partikeln oder Zellen aufgenommen. Die Objekte befinden sich während der Analyse in einer optisch geeigneten Küvette in Suspension.

10

Stand der Technik

- 15 Die bisher auf dem Markt bestehenden, automatischen Systeme zur Untersuchung von Dichte, Viabilität und Durchmesser zellhaltiger Suspensionen biologischen Ursprungs basieren auf der Messung des elektrischen Widerstandes, der elektrischen Kapazität, der Laserdiffraktometrie oder der optischen Bildanalyse.

- 20 Die Auswertung von Objekten mittels optischer Bildaufnahme und einer digitalen Bildanalyse wurde bisher durch die Verwendung eines Mikroskops realisiert, wobei eine Mikroskop-Optik zur Vergrößerung der teilweise nur wenige Mikrometer kleinen Objekte benutzt wird. Das so erzeugte Bild wird mit einer Digitalkamera aufgenommen und von speziellen Computer-Programmen ausgewertet.

- 25 Als Beispiel für das herkömmlich angewendete, automatische Verfahren ist das Cedex System (innovatis AG) zu nennen. Dieses System arbeitet mit einer angepassten Mikroskop-Optik, die es ermöglicht, Zelldichten und Viabilitäten von Suspensionszellen zu

BESTÄTIGUNGSKOPIE

bestimmen. Nach demselben Prinzip wird eine Analyse der Zellkultur durch das nachfolgend entwickelte Vi-CELL System (Beckman Coulter Inc.) durchgeführt. Das zugrundeliegende Verfahren ist durch drei Parameter limitiert, die es nicht erlauben unterhalb einer bestimmten Objektgröße zu detektieren:

5

1. Tiefenschärfe

Um mit Hilfe einer Mikroskop-Optik Objekte in einer Durchflussküvette aufnehmen zu können, müssen über die gesamte Küvettenhöhe hin die Objekte hinreichend scharf abgebildet werden.

10

2. Küvettenhöhe

15

Die Küvette muss so groß sein, dass genügend Objekte für eine statistische Signifikanz aufgenommen werden, und gleichzeitig klein genug, um die Tiefenschärfe über den gesamten Bereich der Küvettenhöhe zu ermöglichen.

20

3. Objektanzahl

Durch die Methode der Bildaufnahme ist es nicht möglich unterhalb einer Objektdichte von 5×10^4 Objekten pro mL Suspension zu detektieren, ohne den Bereich der statistischen Signifikanz zu verlassen.

25

Da die Tiefenschärfe proportional zu $1/NA^2$, die optische Auflösung proportional zu $1/NA$ ist (mit NA = Numerische Apertur), nimmt bei Verkleinerung der Auflösung um detailreichere Bilder zu erhalten die Tiefenschärfe quadratisch dazu ab.

30

Bei dem herkömmlich angewendeten Verfahren wird die Messküvette mit dem Probenmaterial komplett gefüllt und mit der Mikroskop-Optik eine Tiefenschärfe eingestellt, die sich über den gesamten Bereich der Küvettenhöhe erstreckt. Um den

Bereich der statistischen Signifikanz zu erreichen, müssen entsprechend viele Bilder der Probe durch sukzessive Befüllung der Küvette aufgenommen werden.

5 In der EP 1 329 706 A1 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem sich die Probe über die gesamte Küvettenhöhe erstreckt. Die Auflösung des Systems und somit die minimal erforderliche Größe der zu analysierenden Partikel ist beschränkt durch die Tiefenschärfe, die erforderlich ist, um die Probe über die gesamte Küvettenhöhe scharf abzubilden. Die digitale Bildaufnahme erfolgt mittels Kamera, nicht durch einen Scanner. Dieses Patent aus dem Jahr 2003 beschreibt die Funktionsweise des oben genannten Cedex Systems, 10 welches bereits 1997 veröffentlicht wurde (Animal Cell Technology, Proceedings of the 14th Meeting of ESACT, Kluwer Academic Publishers, 1997, Seite 301-305).

In der DE 41 16 313 C2 erfolgt die Sedimentation mehrere Proben gleichzeitig durch eine Zentrifuge. Ziel des Verfahrens ist die Bestimmung elastomechanischer Eigenschaften 15 von Sedimenten aus Suspensionen und Emulsionen.

In der US 6,141,624 A wird beschrieben, wie eine ausreichende Probenmenge zum Nachweis unterschiedlicher Partikel mittels einer Durchflussküvette automatisch zur Verfügung gestellt werden kann.

20

Aufgabe

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es insbesondere, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Aufnahme von Bildern im mikroskopischen Bereich zu schaffen, durch die 25 eine hohe optische Auflösung erzielbar ist. Weitere Aufgabenstellungen ergeben sich aus den insgesamt dargestellten Lösungen und Vorteilen.

Erfindung

30

Die Merkmale der Erfindung sind in den unabhängigen Ansprüchen wiedergegeben. Weitere Merkmale der Erfindung bzw. vorteilhafte Weiterbildungen derselben sind in den Unteransprüchen und in der Beschreibung genannt.

Erfindungsgemäß ist insbesondere die Kombination der folgenden Methoden vorgesehen:

- Einbringen einer Probe in eine Messzelle, insbesondere in eine Durchflussküvette
- Sedimentation der Probe
- 5 - Digitale Bildaufnahme mittels Scanner
- Analysieren der Partikel in der Probe durch Auswertung der Bildaufnahme

Dadurch unterscheidet es sich von den genannten herkömmlichen Verfahren.

- 10 An Stelle einer Mikroskop-Optik mit Autofokus-Mechanik und -Elektronik sowie einer Digitalkamera (gegebenenfalls mit Framegrabber) wird ein Scanner verwendet, der insbesondere alle Funktionen der zuvor genannten herkömmlichen Komponenten ersetzen kann.
- 15 Mit Hilfe des Scanners kann, im Vergleich zum herkömmlichen Verfahren, in einem kurzen Zeitraum mehr Bilddatenmaterial aufgenommen werden. Ist die Probenkammer entsprechend groß, so hat man einen enormen Zeitgewinn, der es erlaubt, die Objekte absinken zu lassen, und in einem geringeren Fokusbereich zu agieren, und damit die optische Auflösung zu erhöhen. Mit diesem Verfahren können dann viel kleinere Objekte
- 20 oder Partikel analysiert werden.

Kurzbeschreibung der Figuren:

- 25 Abbildung 1: Schemazeichnung des herkömmlichen Bildaufnahmeverfahrens
- Abbildung 2: Schemazeichnung des Scanner Bildaufnahmeverfahrens
- Abbildung 3: Schemazeichnung Durchlicht-Verfahren
- Abbildung 4: Schemazeichnung Dunkelfeld-Verfahren
- Abbildung 5: Schemazeichnung Fluoreszenz-Verfahren

30

Abbildungen 1 und 2 zeigen schematisch das herkömmliche und das neue Bildaufnahmeverfahren. Beide Bilder zeigen jeweils eine Durchflussküvette (23) mit

optischer Achse (21) und Durchflussrichtung (22). Der senkrechte Doppelpfeil zeigt den für eine optimale Bildaufnahme benötigten Tiefenschärfebereich an.

Da ein reziprok quadratischer Zusammenhang besteht, wird bei dem neuen Verfahren die
5 höhere optische Auflösung bei geringerer Tiefenschärfe gewählt, um Bilder des Probenmaterials in der Durchflussküvette aufzunehmen. Dies wäre beim herkömmlichen Verfahren nur in einem nicht vertretbaren Zeitrahmen durchführbar.

Das von der erfindungsgemäßen Vorrichtung gelieferte Bilddatenmaterial kann
10 nachfolgend einer Bilddatenanalyse zugeführt werden.

Der wesentliche Vorteil der Vorrichtung ist es, dass eine hohe optische Auflösung einer
Partikel- oder Zellsuspension erzielt wird. Dies wird u.a. durch Absinken der Objekte auf
eine optische Ebene bei gleichzeitig hohem Probenvolumen erreicht. Das Absinken der
15 Objekte kann durch Sedimentation oder weitere geeignete Verfahren erfolgen.

Die unterschiedlichen Techniken zur Ansammlung von Objekten innerhalb der
Messküvette können sein:

- Adhäsion
- 20 - Repulsion
- Elektrische Wirkung
- Magnetische Wirkung
- Gravitation
- Zentrifugation
- 25 - Auftrieb
- Immobilisation
- Kopplung

sowie Kombinationen aus diesen Methoden.

30 Die Vorrichtung eignet sich für mikroskopische Aufnahmen unter Auflicht, Durchlicht, Fluoreszenz, Phasenkontrast, Dunkelfeld und Licht im sichtbaren und nicht-sichtbaren Bereich sowie alle daraus möglichen Kombinationen. Es kann des weiteren die dem aktuellen Stand der Technik entsprechenden weiteren Kontrastverfahren beinhalten.

Die zu untersuchenden Proben können Partikellösungen oder Zellmaterial biologischen Ursprungs sein, das sowohl ungefärbt als auch gefärbt untersucht werden können.

5 Es wird eine Bestimmung der Konzentration und Viabilität zellhaltiger biologischer Proben einer Kultursuspension sowie Apoptoseverhalten, Produktkonzentration und Analyse intrazellulärer Kompartimente und Stoffwechselvorgänge durchgeführt.

10 Es werden darüber hinaus folgende Parameter bestimmt: Durchmesser einzelner Objekte, Aggregationsrate, Geometrie, Anzahl der gezählten Objekte und Abweichung vom Mittelwert sowie Oberflächenbeschaffenheit und Morphologie.

Die Ergebnisdaten und Parameter werden mittels eines Computer-Verfahrens aus den aufgenommenen Bilddaten ermittelt.

15 Basis der Messung ist ein Verfahren (Mikroskopieverfahren und andere), bei dem die partikel-/zellhaltige Probe durch eine Küvette fließt (Durchflussküvette). Es werden mit einem optischen Zeilen- oder Flächensensor digitale Bilder der Probe in der Küvette aufgenommen, die dann mit einem Verfahren zur optischen Bildanalyse ausgewertet werden.

20 Die prinzipielle Idee ist es, eine Vorrichtung (Scanner) so zu konstruieren, dass er die entsprechende Auflösung liefert, um auch im Mikrometer-Maßstab qualitativ hochwertig abbilden zu können. Dieses wird durch eine veränderte Optik, angepasste Autofokusverfahren und eine modifizierte Mechanik erreicht.

25 Die Bildaufnahme erfolgt in diesem Fall entweder durch eine Bewegung der Scannereinheit relativ zur Partikelprobe oder durch eine Bewegung der Partikelprobe relativ zur Scannereinheit. Dazu befindet sich die Küvette senkrecht im optischen Pfad.

30 Die Ausleserate des optischen Sensors wird mit der Verfahrensgeschwindigkeit synchronisiert, so dass ein oder mehrere Bilder entstehen.

Im Folgenden wird ein möglicher Ablauf des Verfahrens aufgelistet und erläutert:

- Einbringen der Probe in die Messküvette
- Absinken der Objekte der Probe in der Lösung
Ansammlung der Objekte in einer optischen Ebene. Beispielfhaft wird dieser Vorgang im Weiteren als Sedimentation bezeichnet.

5 - Scannen

Digitale Bildaufnahme unter Berücksichtigung eines ausreichenden Volumens des Probenvolumens, um mit einem Bild ein statistisch repräsentatives Ergebnis erzielen zu können (siehe auch Abschnitt „Stand der Technik“).

- Analyse des Bilddatenmaterials

10 Speziell angepasste Analyse des Bilddatenmaterials zur Ergebnisermittlung.

- Anzeige und Export der Analysedaten

Benutzerfreundliche Präsentation der Ergebnisdaten als Zahlenwerte sowie als grafische Anzeige.

- 15 Mit diesem Verfahren ist es möglich, dass einzelne Objekte analysiert werden. Für den Fall der Analyse von Zellmaterial biologischen Ursprungs kann eine Analyse von Morphologie, Oberflächenbeschaffenheit etc. erfolgen.

- 20 Der durch die Integration einer Scannereinheit zur optischen Bilderfassung erzielte Nutzen ist gegeben durch die Vergrößerung des Detektionsbereichs. Eine entsprechende Scanneroptik kann von der Auflösung her deutlich geringere Objektdurchmesser analysieren, als es mit dem heutigen Stand der Technik möglich ist. Es können zusätzliche Informationen über Struktur und Morphologie der Objekte gewonnen werden.

- 25 Durch die Methode der Sedimentation kann es nun erstmals ermöglicht werden, dass alle Objekte einer Probe auf einmal aufgenommen und analysiert werden.

- 30 Da durch geeignete Wahl der Messküvette pro Volumeneinheit eine größere Objektanzahl ausgewertet werden kann, wird für das zur Anmeldung vorliegende Verfahren ein geringeres Probenvolumen benötigt, als es bei den Systemen aktueller Bauart üblich ist.

Beispielbeschreibung

Dem beschriebenen Verfahren liegen mikroskopische Aufnahmen zu Grunde, die unter unterschiedlichen Bedingungen generiert wurden: Auflicht, Durchlicht, Fluoreszenzlicht, Phasenkontrast, weitere Kontrastverfahren, Dunkelfeld und Licht im sichtbaren und nicht-sichtbaren Bereich, sowie alle daraus möglichen Kombinationen.

5

Als Beispiel dazu sind im Folgenden mehrere mikroskopische Aufnahmeverfahren beschrieben. Für die Realisierung des Verfahrens können diese und weitere lichtgebende Verfahren miteinander kombiniert werden.

- 10 Die zu untersuchende Probenlösung / Suspension befindet sich in einer Küvette als Messzelle. Nach dem Einbringen des Zellmaterials wird gewartet, bis die zu untersuchenden Objekte auf den Küvettenboden sedimentieren. Dann wird ein Bild aufgenommen. Während der Bildaufnahme bewegen sich Küvette und Scanner relativ zueinander. Das heißt, dass sich entweder die Partikelprobe relativ zur Scannereinheit
- 15 oder die Scannereinheit relativ zur Partikelprobe bewegt. Der Bereich der Küvette, der dabei aufgenommen wird, ist variabel.

Beispiel (a) Durchlicht-Verfahren

20

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung für Durchlicht-Aufnahmen ist in Abb. 3 dargestellt und wird nachfolgend beschrieben.

- Der optische Sensor 8 befindet sich auf der einen Seite der Küvette 6, die Lichtquelle 1
- 25 auf der gegenüberliegenden Seite. Für die Bündelung der Lichtstrahlen und zur Vergrößerung der Abbildung werden Beleuchtungsoptik 2, 3, 4, 5 und Objektiv 7 in den optischen Pfad eingebracht. Die Beleuchtungsoptik besteht aus Kollektorlinse 2, Leuchtfeldblende 3, Kondensorblende 4 und Kondensoroptik 5. Zusätzlich können mehrere Filter in den optischen Pfad eingebracht werden. Zur Beschickung der Küvette 6
- 30 mit der Probenlösung wird diese durch die Einlasskapillare 9 zugeführt und durch die Auslasskapillare 10 abgeführt. Die Bildaufnahme erfolgt entweder durch Bewegung der Scannereinheit relativ zur Partikelprobe 11 oder durch Bewegung der Partikelprobe relativ zur Scannereinheit 12, welche die Bauteile 1-5 und 7-8 aufweist.

Beispiel (b) Dunkelfeldverfahren

Der optische Sensor 8 befindet sich auf der einen Seite der Küvette 6, die Lichtquelle 1
5 auf der gegenüberliegenden Seite. Für die Bündelung der Lichtstrahlen und zur
Vergrößerung der Abbildung werden Beleuchtungsoptik, bestehend aus Kollektorlinse 2,
Leuchtfeldblende 3 und Dunkelfeldblende 15, Kondensoroptik 5 und Objektiv 7 in den
optischen Pfad eingebracht. Zusätzlich können mehrere Filter in den optischen Pfad
10 eingebracht werden. Zur Beschickung der Küvette 6 mit der Probenlösung wird diese
durch die Einlasskapillare 9 zugeführt und durch die Auslasskapillare 10 abgeführt. Die
Bildaufnahme erfolgt entweder durch Bewegung der Scannereinheit relativ zur
Partikelprobe 11 oder durch Bewegung der Partikelprobe relativ zur Scannereinheit 12,
welche auch hier die Bauteile 1-5 und 7-8 aufweist.

15

Beispiel (c) Fluoreszenz-Verfahren

Für Aufnahmen von Fluoreszenz-Bildern im Auflicht-Verfahren wird das von der Probe
kommende Licht zum optischen Sensor geleitet, nachdem es den Strahlenteiler 3 passiert
20 hat, der das Licht zur Probenbeleuchtung in den optischen Pfad einkoppelt.

Der optische Sensor 8 befindet sich auf einer optischen Achse mit der Küvette 6. Die
Strahlen der Lichtquelle 1 werden mittels Beleuchtungsoptik gebündelt und kollimiert,
bevor sie durch den Strahlenteiler 13 über das Objektiv 4 die Probe in der Küvette 6
25 beleuchten. Die Beleuchtungsoptik besteht aus Kollektorlinse 2 und Leuchtfeldblende 3
sowie weiteren Linsen 5 und einer weiteren Blende 4. Zusätzlich können entsprechende
Filter 14 in den optischen Pfad eingebracht werden. Zur Beschickung der Küvette 6 mit
der Probenlösung wird diese durch die Einlasskapillare 9 zugeführt und durch die
Auslasskapillare 10 abgeführt. Die Bildaufnahme erfolgt entweder durch Bewegung der
30 Scannereinheit relativ zur Partikelprobe 11 oder durch Bewegung der Partikelprobe relativ
zur Scannereinheit 12.

Beispiel (d)

Es sollen Anzahl und Viabilität kleiner Partikel, z.B. suspendierter Blutzellen oder Hefen, in einer Probe bestimmt werden. Es liegt ein Probenvolumen von etwa 500 μl vor. Zur Bestimmung der Viabilität wird die Probe eingefärbt.

5

Die Probe wird in die Küvette verbracht, wo die Partikel in der Probe eine bestimmte Zeit lang sedimentieren. Die einzuhaltende Sedimentationszeit hängt vom jeweiligen Sedimentationsverhalten der Partikel in der jeweiligen Suspension, d.h. Dichte der Partikel und Viskosität der Suspension, der Küvettenhöhe sowie der Tiefenschärfe der Bildaufnahmeoptik ab.

10

Nach Ablauf der Sedimentationszeit befinden sich ein repräsentativer Anteil der Partikel auf bzw. in einer durch die optischen Eigenschaften des Systems zulässigen Höhe über dem Küvettenboden, so dass eine ausreichend scharfe Abbildung aller Partikel möglich ist. Zu diesem Zeitpunkt sind außerdem die Partikelbewegungen in Fließrichtung und in Sedimentationsrichtung soweit abgeklungen, dass die verzerrungsfreie Bildaufnahme mit einem Zeilensensor (Scanner) erfolgen kann.

15

Jetzt erfolgt die digitale Bildaufnahme der gesamten Probe in einem Schritt. Die so gewonnenen Bilddaten werden digital aufbereitet und mit bekannten Verfahren analysiert. Als Ergebnis erhält man Partikelkonzentration und Viabilität sowie weitere Merkmale der Partikel, wie z.B. den Durchmesser.

25

Jetzt erfolgt die digitale Bildaufnahme der gesamten Probe in einem Schritt. Die so gewonnenen Bilddaten werden digital aufbereitet und mit bekannten Verfahren analysiert. Als Ergebnis erhält man Partikelkonzentration und Viabilität sowie weitere Merkmale der Partikel, wie z.B. den Durchmesser.

INS-37-WO

21. Dezember 2004/7521

Bezugszeichenliste

5

- | | |
|----|--------------------|
| 1 | Lichtquelle |
| 2 | Kollektorlinse |
| 3 | Leuchtfeldblende |
| 4 | Kondensorblende |
| 5 | Kondensoroptik |
| 6 | Küvette |
| 7 | Objektiv |
| 8 | Sensor |
| 9 | Einlasskapillare |
| 10 | Auslasskapillare |
| 11 | Partikelprobe |
| 12 | Scannereinheit |
| 13 | Strahlenteiler |
| 14 | Filter |
| 15 | Dunkelfeldblende |
| 21 | Achse |
| 22 | Durchflussrichtung |
| 23 | Durchflussküvette |

INS-37-WO

21. Dezember 2004/7521

. Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufnahme mikroskopischer Bilder mit hoher optischer Auflösung von in einer Flüssigkeit suspendierten Partikeln oder Organismen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Suspension in eine Messzelle, insbesondere Durchflussküvette, eingebracht wird und das Bild der Suspension von einem optischen Sensor aufgenommen wird, wobei sich
5 optischer Sensor und Messzelle relativ zueinander bewegen und der Inhalt der Messzelle dabei ganz oder teilweise abgebildet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich der Sensor gegebenenfalls mit optischen Elementen und einer Lichtquelle entlang der Messzelle
10 bewegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich die Messzelle entlang des Sensors und gegebenenfalls der optischen Elemente und der Lichtquelle bewegt.
15
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messzelle (Küvette) durch die Bewegung optischer Elemente ganz oder teilweise auf den optischen Sensor abgebildet wird.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach dem Einbringen der Suspension die enthaltenen Partikel zunächst auf den Boden der Messzelle oder in einen Bereich oberhalb des Bodens absinken und damit nur noch ein Teil der Messzelle die zu untersuchenden Partikel oder Organismen enthält, so dass dieser Bereich mit einer hohen optischen Auflösung
25 abgebildet und vom optischen Sensor erfasst werden kann.
6. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach dem Einbringen der Suspension die enthaltenen Partikel zunächst zur oberen Begrenzungsfläche der Messzelle oder in einen Bereich unterhalb

der oberen Begrenzungsfläche aufsteigen und damit nur noch ein Teil der Messzelle die zu untersuchenden Partikel oder Organismen enthält, so dass dieser Bereich mit einer hohen optischen Auflösung abgebildet und vom optischen Sensor erfasst werden kann.

- 5 7. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Absinken oder Aufsteigen der Objekte innerhalb der Küvette durch unterschiedliche biologische, physikalische oder chemische Techniken sowie durch Sedimentation oder Auftrieb erfolgen kann.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf einer Seite der Messzelle, Objektiv (und gegebenenfalls Blendensysteme) und der optische Sensor auf der anderen, gegenüberliegenden Seite der Messzelle angeordnet sind (Durchlichtbeleuchtung).
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf derselben Seite der Messzelle angeordnet sind, wie Objektiv (und gegebenenfalls Blenden) und der optische Sensor (Auflichtbeleuchtung).
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Durchlichtbeleuchtung als Hellfeldbeleuchtung ausgelegt wurde.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Durchlichtbeleuchtung als Dunkelfeldbeleuchtung ausgelegt wurde.
12. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Durchlichtbeleuchtung als Phasenkontrastbeleuchtung mit den bekannten Phasenkontrastverfahren ausgelegt werden kann.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Auflichtbeleuchtung als Fluoreszenzbeleuchtung mit den bekannten Fluoreszenzverfahren ausgelegt werden kann.

14. Verfahren nach Anspruch 10,11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine geeignete Lichtquelle oder Einbringen eines oder mehrerer geeigneter Filter es ermöglicht, die Objekte in der Küvette mit einer definierten spektralen Intensitätsverteilung des einfallenden Lichtes zu beleuchten (Beleuchtungsseite).

5

15. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12, 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine geeignete Lichtquelle oder Einbringen eines oder mehrerer geeigneter Filter es ermöglicht, den optischen Sensor mit einer definierten spektralen Intensitätsverteilung des einfallenden Lichtes zu beleuchten (Nachweisseite).

10

16. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12, 13 oder 14 **dadurch gekennzeichnet**, dass die in den Ansprüchen genannten Beleuchtungsarten auch in den daraus resultierenden möglichen Kombinationen angewendet werden können.

15

17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zu untersuchende Suspension mit Farbstoffen versetzt ist.

18. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass alle oder ein Teil der eingesetzten Filter automatisch oder manuell gewechselt werden.

20

19. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass alle oder ein Teil der eingesetzten Objektive automatisch oder manuell gewechselt werden.

20. Vorrichtung zur Aufnahme mikroskopischer Bilder mit hoher optischer Auflösung von in einer Flüssigkeit suspendierten Partikeln oder Organismen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Suspension in eine Messzelle, insbesondere Durchflussküvette, eingebracht wird und das Bild von einem optischen Sensor aufgenommen wird, wobei optischer Sensor und Messzelle relativ zueinander bewegbar und der Inhalt der Messzelle dabei ganz oder teilweise abbildbar ist.

30

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf einer Seite der Messzelle, Objektiv (und gegebenenfalls Blendensysteme) und der optische Sensor auf der anderen, gegenüberliegenden Seite der Messzelle angeordnet sind (Durchlichtbeleuchtung).

22. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf derselben Seite der Messzelle angeordnet sind, wie Objektiv (und gegebenenfalls Blenden) und der optische Sensor (Auflichtbeleuchtung).
- 5

Abbildung 1

Schemazeichnung des herkömmlichen Bildaufnahmeverfahrens

5

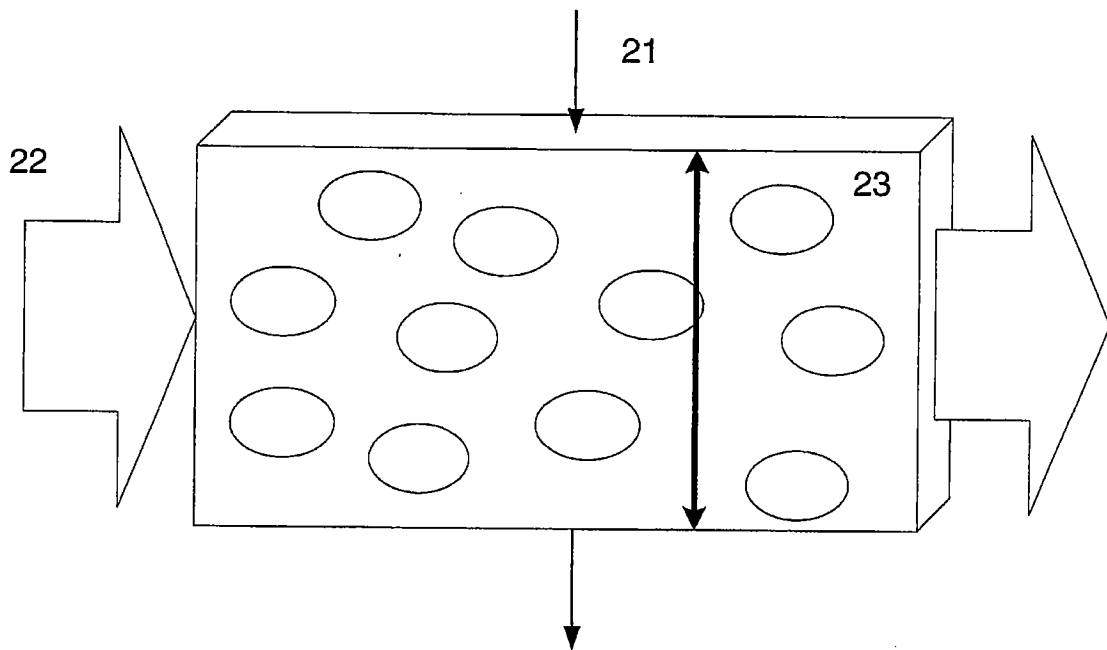


Abbildung 2

Schemazeichnung des Scanner Bildaufnahmeverfahrens

5

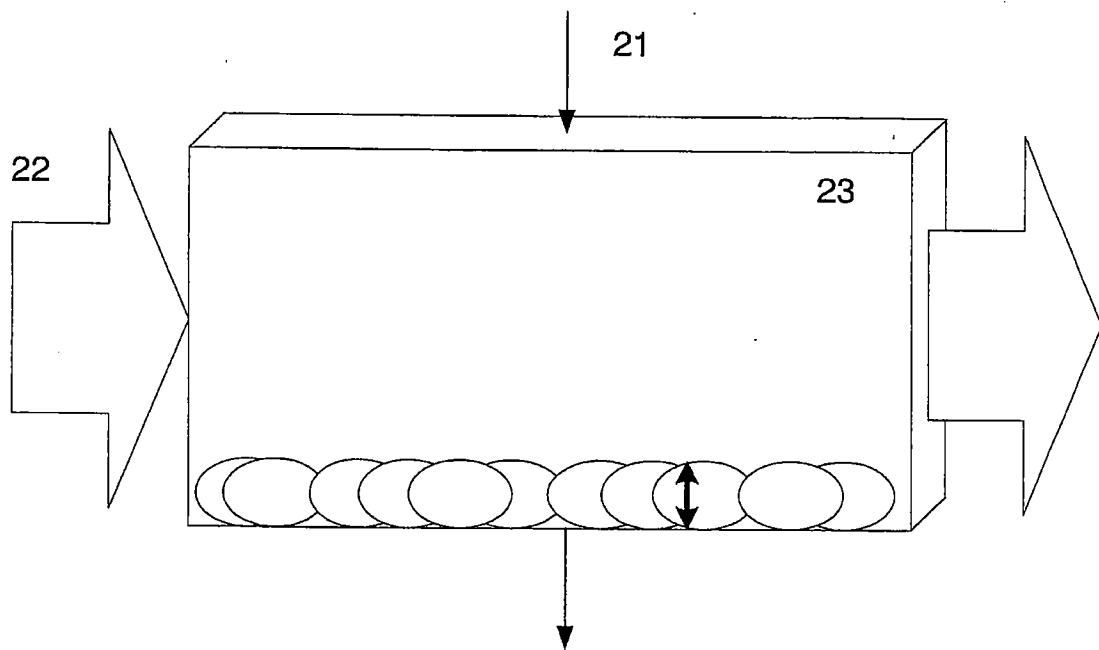


Abbildung 3

Schemazeichnung Durchlicht-Verfahren

5

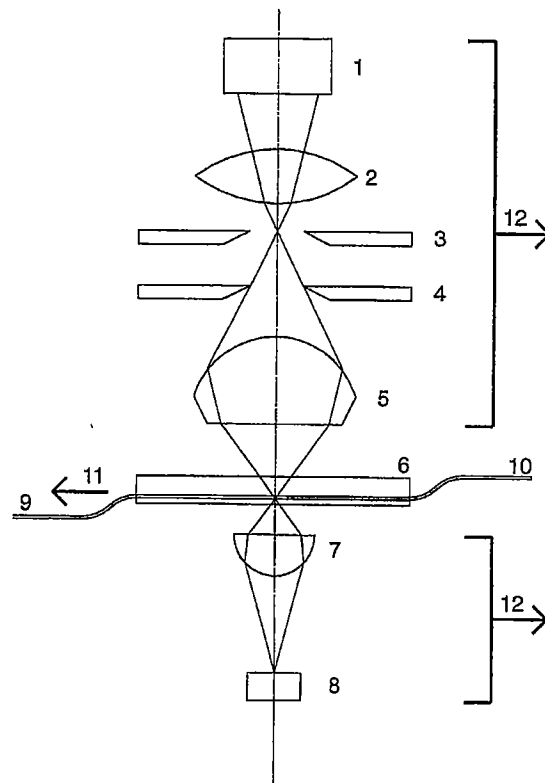


Abbildung 4

Schemazeichnung Dunkelfeld-Verfahren

5

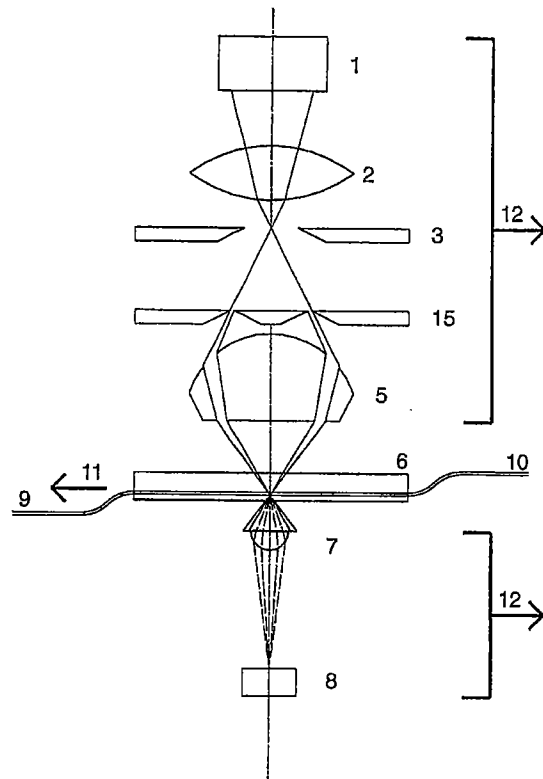
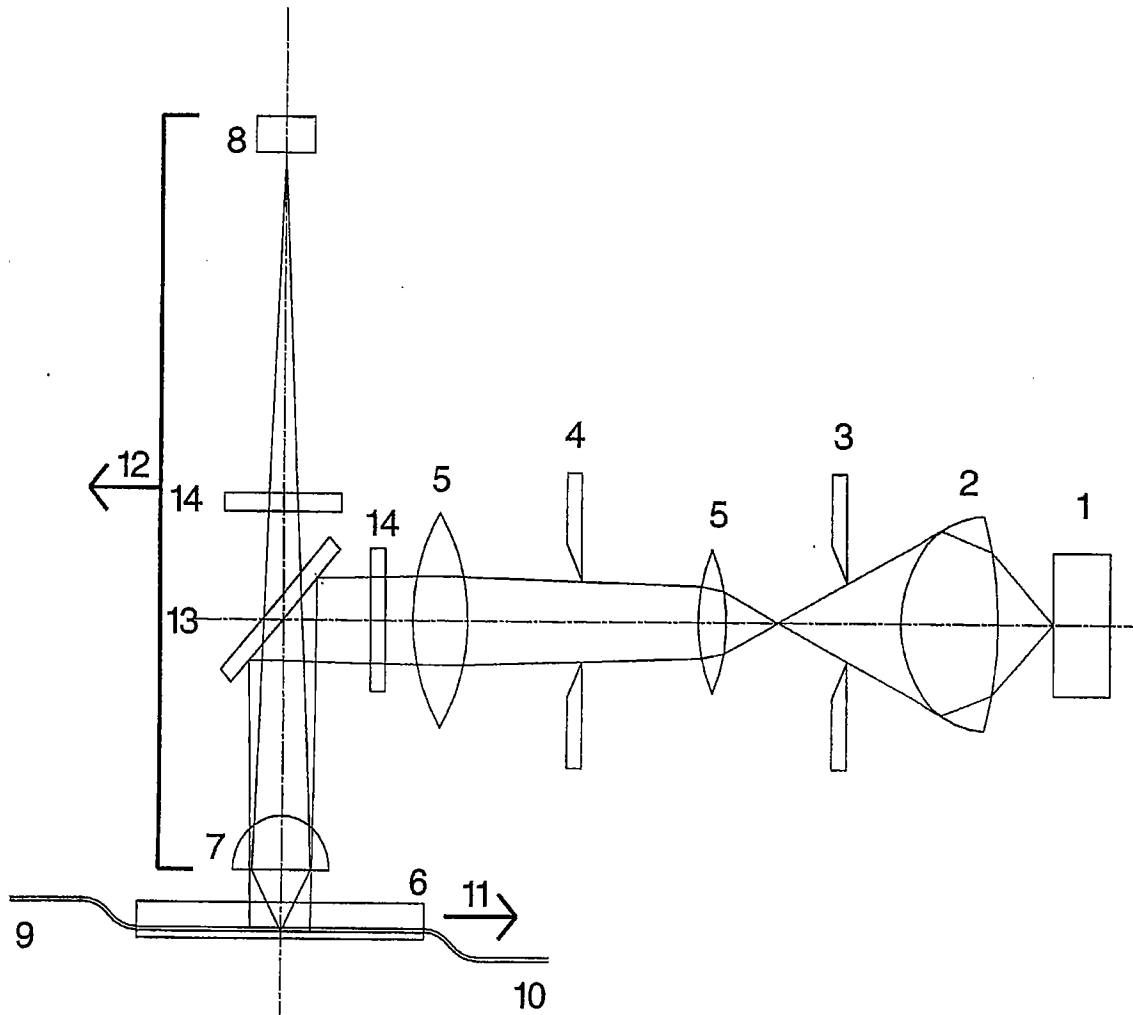


Abbildung 5

Schemazeichnung Fluoreszenz-Verfahren

5



10

15
